

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO**

**TRABAJO FINAL**

**Título del trabajo:**

Efecto del ejercicio sobre los valores hematológicos y su relación con el daño en la membrana del eritrocito en equinos.

**Tema del trabajo:**

Estrés oxidativo en células sanguíneas de equinos provocado por el ejercicio.

**Autor:** Savignone, Cesar Augusto

**Directora:** Dra. MV. Pintos María Eugenia.

**Codirector:** Dr. MV. Palacios Alejandro

**Año:** 2017

*A mis hijos, Santiago, Francisco y Josefina,*

*.....Mi principal motivación, los motores que  
me obligan a funcionar y tratar cada día de ser mejor.*

**Índice:**

Reconocimientos y agradecimientos .....	4
Resumen .....	5
Introducción .....	6
Respuesta hematológica al ejercicio .....	6
Estrés oxidativo .....	11
Eritrocitos y estrés oxidativo .....	12
Hipótesis y objetivos .....	15
Metodología .....	16
Animales experimentales .....	16
Test de ejercicio estandarizado .....	16
Protocolo de ejercicio .....	17
Obtención de muestras de sangre .....	17
Procesamiento de muestras .....	18
Hematología .....	18
Obtención de la suspensión de eritrocitos lisados .....	18
Peroxidación de las muestras y análisis por quimioluminiscencia .....	19
Análisis estadístico .....	20
Resultados .....	20
Valores hematológicos .....	20
Grado de peroxidación .....	22
Correlación entre variables .....	24
Conclusiones y discusión .....	25
Bibliografía .....	27

**Reconocimientos:**

*A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de la Plata, por brindar formación de excelencia.*

*Al comité de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, en la persona de Eduardo Mortola, por ir en busca de la perfección, y darme la oportunidad de realizar esta formación de Post Grado.*

*A la Cátedra de Bioquímica y al Servicio Central de Laboratorio de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP, en las personas de Alejandro Palacios y María Sandra Arauz, por permitirme desarrollar este trabajo en los lugares a su cargo.*

*Al Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino de Deporte, en la persona de Pablo Trigo, por permitirme utilizar equipamientos e instalaciones para poder desarrollar este trabajo.*

*Al Hospital Escuela de Grandes Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, en la persona de Marcos Muriel, por facilitarme los animales utilizados en este trabajo.*

**Agradecimientos:**

*A Eugenia, mi directora, por su infinita paciencia, generosidad y apoyo.*

*A Alejandro, mi co-director, por darme un lugar de trabajo sin condicionamientos y por su interminable ayuda.*

*A Marcos y Ramon, por su continua colaboración.*

*A mis compañeros de la Cátedra de Bioquímica y del Servicio Central de Laboratorio, por el apoyo, por soportarme diariamente, y por haberme dado el tiempo para que este trabajo sea posible.*

## **Resumen:**

El ejercicio físico es considerado como un estrés para el organismo, ya que genera diferentes tipos de respuestas relacionadas con el tipo y duración del mismo, poniendo a prueba su capacidad de adaptación. En este trabajo se evaluó la respuesta a nivel hematológico de los glóbulos rojos y la presencia de alteraciones oxidativas en sus membranas, en equinos sometidos a una prueba de ejercicio de alta intensidad. Los resultados indican un aumento considerable del número de glóbulos rojos, valor hematocrito y concentración de hemoglobina, alcanzando valores máximos al llegar los equinos al punto de fatiga durante el test de ejercicio, para luego descender durante la recuperación aeróbica. Los tres parámetros se comportaron en forma similar. En relación al daño en la membrana de los glóbulos rojos, la misma se estimó mediante el grado de peroxidación, medido por quimioluminiscencia, a lo largo del período de ejercicio, siendo esta máxima también en el momento de agotamiento por ejercicio, manteniéndose estables los valores tras la recuperación. La correlación entre los valores hematológicos estudiados y el grado de daño de la membrana de los eritrocitos muestra que, a pesar del aumento de glóbulos rojos circulantes, debido principalmente a esplenotomía, los mismos se encuentran dañados, consecuencia del ambiente oxidante predominante durante la etapa de máximo ejercicio.

## **Introducción:**

### **Respuesta hematológica al ejercicio:**

El ejercicio físico genera diferentes tipos de respuestas en un individuo que dependen del tipo y la duración del mismo, ya que supone un estrés para el organismo que pone a prueba su capacidad de adaptación. El ejercicio intenso supone un estrés máximo, llegando en casos extremos, si determinadas situaciones se mantuvieran por periodos moderadamente o sumamente prolongados, a resultar letales (Posada Arias y col., 2013).

El organismo responde de diversas maneras con respecto a la exigencia física, principalmente debido a que necesita preservar un nivel de homeostasia, sin que dicha exigencia conlleve a daños importantes a nivel orgánico o sistemático. Dicha respuesta va a estar relacionada con el tipo de ejercicio y a su vez por el tiempo del mismo (Bonilla, 2005).

En lo referente al sistema hematológico, diversos autores, tanto en humanos como en diferentes especies animales, refieren cambios en el volumen sanguíneo, en las poblaciones celulares de glóbulos blancos y rojos, así como modificaciones en el conteo y la forma de las plaquetas, existiendo relación entre el ejercicio y los cambios mencionados.

La respuesta hematológica al ejercicio puede ser de tipo aguda o crónica. En diferentes estudios en humanos, la respuesta aguda se puede caracterizar por una hemoconcentración debido a la deshidratación por la pérdida de líquidos a través de la sudoración, así mismo es visible un incremento en la concentración de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto) y número de eritrocitos mientras que el volumen plasmático disminuye conllevando así a la disminución del volumen sanguíneo total. Esta respuesta tiende a aumentar cuando el reto físico es más exigente o prolongado, y tiende a disminuir entre mayor sea el grado de entrenamiento del atleta (Novosadova, 1970; Myhre y col., 1985; Schmidt y col., 1989). En el caso de la respuesta crónica, directamente relacionada con el entrenamiento, se ha podido apreciar en cambio disminución en los niveles de hemoglobina, hematocrito y conteo eritrocitario, con incremento del volumen plasmático. A esta entidad en humanos se la conoce como anemia del deportista o pseudoanemia (Remacha y col., 1993; Bonilla, 2005). Estos cambios van acompañados por cierto grado de hemolisis intravascular y procesos oxidativos debido a la liberación de radicales libre durante el ejercicio (Bonilla, 2005).

Se ha determinado que el incremento en el número de eritrocitos durante el ejercicio, se debe principalmente a un proceso de esplenotomía, por estimulación

nerviosa simpática (Bonilla, 2005), como consecuencia de procesos de hipoxia y acidosis generados durante el ejercicio intenso, lo que a su vez lleva a una esplenotransfusión más fuerte (Leleu y col., 2005).

Diversos estudios realizados en personas que desarrollan ejercicios de larga duración e intensidad, principalmente corredores de maratón, han constatado que al finalizar la misma se pueden determinar una serie de modificaciones en el hemograma, encontrándose aumentados los valores de hematocrito, recuento eritrocitario y concentración de hemoglobina, en comparación con los valores determinados previamente al inicio de la carrera (Nuviala y col., 1993; Reid y col., 2004; Lippi y col., 2010). Estos cambios se deben en parte a la hemoconcentración producida por la deshidratación encontrada en los corredores, aunque, existen discrepancias entre los autores acerca de los resultados obtenidos, lo cual puede explicarse por la diferencia en el tiempo transcurrido y la ingesta o no de líquidos desde la finalización de la carrera hasta la determinación hematológica, ya que estos factores afectan a la hemoconcentración (Ruiz-Vicente y col., 2013).

Ya en el año 1970, Novosadova, J., en un estudio realizado en humanos, planteó que las modificaciones encontradas a nivel hematológico varían con el ejercicio agudo y crónico, así como con la intensidad y el tiempo utilizado en el mismo, siendo menores las variaciones encontradas en las personas sometidas regularmente a entrenamiento físico que en aquellas que no están acostumbradas. También en humanos, se ha informado que, como respuesta aguda al ejercicio, durante y hasta una hora después de una actividad física extenuante, existe deshidratación y hemoconcentración con aumento en la concentración de hemoglobina y el hematocrito hasta en un 18 % superior al dato en reposo (Guillen y col., 1991).

En concordancia, los estudios realizados en diferentes especies animales muestran que, en relación a los eritrocitos, tras un ejercicio enérgico y prolongado, se producen aumentos de la masa globular total dentro de un volumen plasmático proporcionalmente mayor (Boucher y col., 1981; Escribano y col., 1995; Gouveia y col., 2003; Umbarila Barreto, 2007) con resultados similares a los mencionados en humanos en cuanto a los tres parámetros analizados.

Además, fue hallada una relación entre el grado de entrenamiento y el número de células rojas por milímetro cúbico de sangre, así como del contenido de hemoglobina y el valor del hematocrito, con un aumento significativo después del entrenamiento para estos parámetros (Tyler-McGowan y col., 1999; Umbarila Barreto, 2007).

Con respecto a los mecanismos implicados en estas variaciones hemáticas, durante el ejercicio se ponen en juego dos factores principales: esplenotransfusión e

hipoxia tisular. El bazo es el principal reservorio de eritrocitos del caballo, perro y gato. Su capacidad de almacenamiento y movilización es superior a la de otros animales domésticos, pudiendo llegar a almacenar de la tercera parte a la mitad del volumen total de eritrocitos. La sangre esplénica es una o dos veces más rica en eritrocitos que la sangre circulante (García y col., 1999). La contracción del bazo se va a producir no solamente como consecuencia del ejercicio, sino también debido a la liberación de adrenalina por la estimulación simpática, que se origina incluso antes de realizar el esfuerzo, como consecuencia de la más ligera manipulación, la excitación psíquica, o la menor actividad muscular producida antes de una carrera (Evans y Rose, 1988; Snow, 1990), y en algún grado a la hemoconcentración resultante de un paso de fluidos fuera del compartimento intravascular (Milne y col., 1976).

Los equinos tienen la capacidad de incrementar rápidamente la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre por incrementar la concentración de hemoglobina sanguínea a través de la contracción del bazo. La esplenotransfusión anticipada al ejercicio y durante el mismo incrementa la masa de células rojas circulantes sin un incremento concomitante del volumen plasmático. Esta esplenotransfusión aumenta significativamente la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre arterial en más de 50% a los tejidos periféricos (Muriel, 2016).

En caninos sometidos a una competencia deportiva se destaca el incremento en el número de glóbulos rojos durante el ejercicio de acuerdo con la intensidad, la duración y la carga de trabajo debido a esplenotransfusión por estímulo nervioso simpático, así como también las modificaciones en la serie blanca y en las plaquetas (Posada Arias y col., 2013).

Si bien el recuento eritrocitario y el hematocrito aumentan con el ejercicio como se mencionó anteriormente, el volumen corpuscular medio refleja una disminución del 13% promedio. Se puede decir que las células rojas movilizadas por la contracción del bazo crean una población de eritrocitos en movimiento, caracterizada por células de un tamaño medio más pequeño (hipovolémicas) que las observadas en la población de eritrocitos en caballos en reposo. Estas células son glóbulos rojos de forma anormal que aparecen en la sangre periférica de caballos de cualquier raza, después de haber efectuado un ejercicio tanto aeróbico como anaeróbico y se visualizan al microscopio como unas células esféricas con una serie de prolongaciones cortas o espículas, recibiendo el nombre de equinocitos. Su proporción aumenta con la intensidad del ejercicio, de tal forma que una contracción fuerte del bazo provocaría un aumento en su número y la aparición de equinocitos aún más pequeños (Rubio Luque, 1995).



También se han mencionado diferencias en cuanto a los valores de la serie roja en equinos de salto, sometidos a un régimen de entrenamiento progresivo, aunque las diferencias se hicieron significativas a partir de los 45 días de entrenamiento (Gomez y col., 2004).

En equinos cuarto de milla, se pudo encontrar una variación en el hematocrito y en la concentración de hemoglobina debido principalmente a redistribución de los fluidos del cuerpo y a una liberación masiva de eritrocitos desde el bazo. Así mismo se pudo observar un leve descenso en los valores de hemoglobina corpuscular media, probablemente debido a los mismos factores (Kästner y col., 1999).

Diversos autores sostienen que el entrenamiento constituiría un estímulo eritropoyético, como respuesta adaptativa para aumentar la capacidad de transporte de oxígeno optimizando el metabolismo energético aeróbico del equino de deporte, que se refleja en el aumento de los valores de la línea roja (Deldar y col., 1982; Jablonska y col., 1991).

En equinos pura sangre de carrera se ha demostrado que determinar los cambios provocados por el ejercicio sobre el volumen total de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina pueden ser indicadores confiables para evaluar la aptitud física y el nivel de entrenamiento que presenta un caballo para realizar un determinado ejercicio (Evans y col., 1993).

En relación a la línea blanca, se ha informado leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis posterior a una actividad física, desarrollada a partir de una movilización celular sanguínea consecuente al estímulo simpático. También se ha citado la observación de un cierto grado de eosinopenia, debido a que la situación estresante consecuente al ejercicio provoca que los eosinófilos se retiren de la circulación, acantonándose en distintos lugares de reserva (mucosa gástrica, pulmones, tejido linfático, etc.) (Posada Arias y col., 2013).

Sobre las plaquetas, el ejercicio intenso genera una trombocitosis fisiológica producida como consecuencia de la movilización de estos elementos desde el bazo, el pulmón y otros compartimientos corporales (Posada Arias y col., 2013).

Estas modificaciones en los distintos valores sanguíneos están fuertemente relacionadas entre sí y pueden determinar y redundar en el rendimiento del animal deportista (Tyler-McGowan y col., 1999).

El análisis de la bibliografía existente en relación al tema muestra sin embargo algunas discrepancias en relación a los resultados. Estas variaciones pueden deberse en parte porque muchas variables están influenciadas por la hemoconcentración y ésta a su vez depende de la deshidratación y de los cambios en el volumen plasmático;

además, ambos valores se ven influenciados por aspectos como la temperatura y humedad del ambiente (Rubio Luque, 1995).

Se puede decir que los valores analizados en relación a la serie roja (recuento eritrocitario, hematocrito y concentración de hemoglobina), están con frecuencia aumentados en los primeros momentos de un ejercicio (esplenotransfusión) y que, después de ejercicios de larga duración, al pasar el líquido intersticial a la sangre, expandiendo su volumen, la dilución resultante disminuye los valores relativos de estos parámetros, aunque estos valores varían de acuerdo al grado de deshidratación provocado por el ejercicio en sí (López Chicharro, 2008).

El mecanismo, por el cual se produce la expansión del volumen plasmático como respuesta al entrenamiento físico, no es bien conocido. La transferencia de líquidos desde el intersticio hacia los capilares estaría justificada por un fenómeno de hemodilución que se ha relacionado con varios hechos:

- Posibilidad de activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, con la consecuente retención renal de sodio.
- Aumento de la secreción de hormona antidiurética, la que provoca la reabsorción de agua a nivel del riñón.
- Aumento en la concentración total de proteínas, provocado por la filtración de proteínas intersticiales al lecho sanguíneo procedentes del torrente linfático. Estas proteínas provocarían un aumento de la osmolaridad que justificaría la atracción de agua y aumento del volumen plasmático.

Es importante remarcar que todos estos procesos intervienen positivamente en la disponibilidad del oxígeno por unidad de volumen de sangre y optimizan el transporte de oxígeno a los tejidos, hecho más que importante en un animal deportista (Rubio Luque, 1995). Esta mayor disponibilidad representa un ajuste compensatorio para la caída en la presión parcial de oxígeno arterial y la saturación de la hemoglobina durante el ejercicio y se produce inicialmente debido a la contracción esplénica y a la redistribución de fluidos corporales circulantes, resultante del aumento de la presión arterial y, posteriormente, a la reducción del volumen plasmático consecuente de la deshidratación, lo que estaría relacionado con las variaciones observadas en las variables analizadas en relación a los glóbulos rojos (López Chicharro, 2008).

### **Estrés oxidativo:**

En los organismos aeróbicos el oxígeno ( $O_2$ ), es esencial para la vida ya que es la molécula fundamental para el metabolismo energético, pero puede ser tóxico y se halla implicado en numerosas enfermedades y condiciones degenerativas (Marx, 1985).

El  $O_2$  es utilizado por el organismo como el oxidante terminal en la cadena respiratoria mitocondrial, No obstante, la presencia de  $O_2$  intracelular puede derivar en la ocurrencia de reacciones de óxido-reducción que pueden dañar a cualquier biomolécula (Imlay y Linn, 1986). Este proceso ocurre cuando se originan compuestos denominados genéricamente como especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y por la generación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que a su vez puede generar hidroxilos en presencia de metales de transición (Marlin y col., 2002). Las ROS contribuyen al daño molecular y estructural que se presenta en una serie de padecimientos en donde la capacidad antioxidante del organismo es rebasada y por lo tanto incapaz de inactivar las ROS, dando lugar al proceso llamado estrés oxidativo.

El daño provocado en las células es inducido por los radicales libres (especies químicas que tienen un electrón no pareado) ya que tienen el potencial de reaccionar con una variedad de especies químicas. Los radicales libres participan en un amplio rango de funciones biológicas como la señalización celular y procesos enzimáticos (reductasas, peroxidasas, catalasas y oxidasas), al ser capaces de oxidar a muchas biomoléculas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos, sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Ji, 1996). Se ha demostrado que un exceso en la producción de estas especies reactivas o un desequilibrio entre estas sustancias oxidantes y los mecanismos antioxidantes de los organismos, es capaz de producir daño a los organismos vivos por un proceso conocida como estrés oxidativo. Actualmente se asume que una cantidad controlada de ROS, no solo no son deletéreas, sino que son útiles para el normal funcionamiento de células y tejidos (Droge, 2002)

Es sabido que los radicales libres afectan lípidos muy fácilmente por atacar a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), presentes en la membrana celular, proceso conocido como peroxidación lipídica (destrucción oxidativa de PUFAs) (Dillard y col., 1978).

El daño oxidativo de los lípidos puede generar desorganización, disfunción y destrucción de membranas (Halliwell y Gutteridge, 1990). Esto puede deberse a una disminución de su fluidez, inactivación de receptores y enzimas, permeabilidad a iones

aumentada y eventualmente, ruptura de membrana (Gutteridge y Halliwell, 1990; Gutteridge, 1995).

Se debe considerar que la presencia de estrés oxidativo no implica automáticamente el daño oxidativo. El estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de ROS. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Venereo Gutierrez, 2002).

Los eritrocitos son una estructura biológica única, que contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, oxígeno molecular e iones ferrosos. Por estas razones podría esperarse que sean altamente vulnerables a los peligros potenciales de un ambiente aeróbico, es decir, a los radicales libres de oxígeno. Sin embargo, poseen una gran variedad de mecanismos de protección; y varios estudios han demostrado que los eritrocitos normales son excepcionalmente resistentes al daño oxidativo. Además, son células de fácil obtención lo que los convierte en un excelente modelo para estudiar la fisiopatología celular (Herlax y col., 2011, Kumar, 2011)

Existe evidencia experimental indicativa del aumento en la producción de ROS, así como de estrés oxidativo y de daño tisular asociados al ejercicio físico (Inayama y col., 2000) por lo que el ejercicio se considera como una condición de generación excesiva de ROS, que resulta asimismo en respuestas compensatorias por parte de los sistemas antioxidantes (Vollaard y col., 2006).

La formación de radicales libres durante el ejercicio depende de la intensidad, frecuencia, duración y tipo del mismo. Altos niveles en el consumo de oxígeno durante el ejercicio también han estado implicados como factor que contribuiría al estrés oxidativo (Williams y col., 2005; Kirschvink y col., 2008).

### **Eritrocitos y estrés oxidativo:**

En relación a las células sanguíneas, los eritrocitos circulantes están expuestos regularmente a condiciones de estrés y son especialmente vulnerables ya que no tienen ningún mecanismo de reparación de la membrana ni capacidad regenerativa. El trabajo de Cimen M, del año 2008, realiza un informe de esta situación.

Los mecanismos de generación de ROS no están completamente claros, aunque se considera que entre sus fuentes se incluyen la oxidación de hemoglobina en la misma sangre y los procesos de isquemia reperusión en diversos tejidos (Muriel, 2016).

Estos mecanismos pueden actuar de forma sinérgica y su magnitud se halla relacionada con el tipo de ejercicio realizado y su intensidad (Finaud y col., 2006).

Durante el desarrollo mismo del ejercicio, el proceso de oxidación de oxihemoglobina a methaemoglobina, como se muestra en la figura 1, genera una gran cantidad de radicales libres por liberación de  $O_2^-$ , cuyo valor se halla en relación directa al tipo de ejercicio realizado y a la necesidad de oxígeno en los diversos tejidos (Clemens y Waller, 1987).

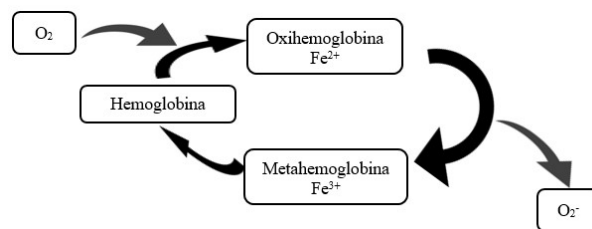


Fig. 1: Generación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) durante la oxidación de oxihemoglobina a methaemoglobina (modificado de Gohil y col., 1988).

Con respecto al mecanismo de isquemia-reperusión, durante la realización de un ejercicio el flujo de sangre se restringe en algunas áreas (riñones y región esplácica) para desviarse a los músculos activos. Esto produce un estado de hipoxia transitoria en las zonas restringidas, directamente relacionada con la magnitud del ejercicio (Adams y Best, 2002). También los músculos sufren hipoxia relativa durante el ejercicio realizado a intensidades por encima del consumo máximo de oxígeno, ya que el suministro del mismo no puede satisfacer las necesidades de energía. Si bien durante la hipoxia disminuye la actividad de la cadena transportadora de electrones, la cual es la principal fuente de ROS, algunos estudios indican un aumento de estos peligrosos agentes oxidativos (Chandel y col., 2000; Zepeda y Farias, 2013). Finalmente, la reoxigenación de estos tejidos, conocida como pago de la deuda de oxígeno, se produce después de la cesación del ejercicio, lo que conduce a un aumento de la generación de ROS (Ji, 1999).

Existe además una causa adicional de generación de ROS, que es el mecanismo inflamatorio a partir de los polimorfonucleares neutrófilos. Cuando estos se activan, liberan  $O_2^-$ , por lo tanto, si existe lesión tisular causada por el ejercicio intenso, la activación subsiguiente de los neutrófilos se convierte en una fuente de ROS. Estas

células activadas pueden causar peroxidación lipídica en células vecinas, como los eritrocitos (Ji, 1996).

El daño oxidativo sólo puede ser verificado mediante la medición directa de distintos marcadores de este proceso. La peroxidación es por lejos el biomarcador de daño oxidativo más extensamente estudiado después del ejercicio (Deaton y Marlin, 2003).

Diversos trabajos tanto en medicina humana como en veterinaria se han desarrollado para el estudio de la peroxidación en los glóbulos rojos, a partir de la adición de distintos pro-oxidantes como hidroperóxido de cumeno (Tesoriere y col., 2001), hidroperóxido de terbutilo (t-BHP) (Mawatari y Murakami, 2001; Zou y col., 2001; Iglesias y Catalá, 2005) e hidroperóxidos de ácidos grasos (Mawatari y Murakami, 1998; Udilova y col., 2003), los cuales han sido realizados a partir de suspensiones de fantasmas de eritrocitos (Mawatari y Murakami, 1998, 2001; Tesoriere y col., 2001; Zou y col., 2001; Udilova y col., 2003; Iglesias y Catalá, 2005; Muriel, 2016), así como también a partir de células lisadas (Sajewicz, 2010; Sajewicz y col., 2015; Savignone y col., 2016, Savignone y Palacios, 2017).

**Hipótesis:**

En equinos sometidos a una rutina de ejercicio, las variaciones hematológicas detectables en el hemograma presentan vinculación con la peroxidación originada en los eritrocitos por el aumento de radicales libres.

**Objetivos:**

**General:**

- Analizar y relacionar en diferentes etapas de una rutina de ejercitación en equinos, los valores hematológicos y la peroxidación producida en los eritrocitos.

**Específicos:**

- Describir las modificaciones observables de la serie roja en el hemograma de equinos en diferentes etapas de una práctica de ejercicio.
- Caracterizar el daño en la membrana de los glóbulos rojos de equinos mediante la estimación del grado de peroxidación mediante quimioluminiscencia a lo largo de un período de ejercicio.
- Evaluar la relación existente entre las variaciones en los valores hematológicos y el daño en la membrana de los eritrocitos provocado por la presencia de radicales libres en equinos sometidos a una rutina de ejercicio.

### **Metodología:**

#### **Animales experimentales:**

Se utilizaron 5 equinos adultos, 3 árabes puros y 2 cruza árabes, con un excelente estado nutricional y de salud y un peso promedio de 440 Kg. Los mismos fueron alojados en boxes del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata durante todo el período de ensayo. Los animales se alimentaron en base a un 2,5% del peso corporal de materia seca. La dieta presentaba una relación 50:50 de heno (rollo de pastura) y concentrado (alimento balanceado con un 12% de proteína y 2,75 Mcal/Kg), y agua ad-libitum.

#### **Test de ejercicio estandarizado:**

Los test de ejercicio estandarizado son test de esfuerzo físico con velocidad controlada, en muchos casos incremental, los cuales permiten reproducir o simular un esfuerzo de competencia máxima bajo condiciones controladas.

En el presente experimento los equinos realizaron los test en el Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata, sobre una cinta ergométrica para equinos, marca Kagra, modelo Mustang 2200 (foto 1). La misma se encuentra instalada en un edificio con las siguientes dimensiones: largo 14,6 metros, ancho 9 metros y alto 10 metros. Este edificio consta de un piso de goma antideslizante para evitar que los equinos resbalen, dos ventiladores frontales para poder simular la fricción del viento cuando el animal corre sobre una pista, un reloj de pared en donde se registran la presión barométrica (mbar), temperatura (°C), y la humedad relativa ambiente (%), para saber las condiciones ambientales donde el animal realiza el esfuerzo físico.



Foto 1: Equino durante el test de ejercicio



Las características técnicas de la cinta ergométrica son:

- Longitud: 10,3 metros.
- Ancho: 3,64 metros.
- Altura del piso a la banda: 0,55 metros.
- Altura máxima: 4,3 metros.
- Peso: 3770 kg.
- Dimensiones del tapiz rodante: 4 metros de largo por 1,2 metros de ancho.
- Velocidad de la máquina: rango de 0 a 15 m/seg.
- Porcentaje de inclinación: rango de 0 a 11 %.
- Factor de carga permanente: hasta 700 kg.
- La velocidad y porcentaje de inclinación es manejado, por una computadora que contiene un programa para tal efecto.

### **Protocolo de ejercicio:**

Previo a la realización de los test de ejercicio todos los equinos tuvieron un período de adaptación a la cinta (ascenso y descenso a la cinta sin rodarla, caminata, luego trote y para finalizar galope).

El test de ejercicio estandarizado utilizado consistió en un precalentamiento de 1 min. a 1,5 m/seg. y 4 min. a 4 m/seg; a continuación, y con un 3 % de pendiente se realizaron etapas de 1 min. de duración con intensidades crecientes (5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13 m/seg, etc.) hasta alcanzar el punto de fatiga. Alcanzado el mismo se realizó la fase de recuperación sin pendiente a 4 y 1,5 m/seg. durante 4 y 1 min. respectivamente (Muriel, 2016).

A cada equino se le realizaron tres test con un intervalo no menor de una semana.

### **Obtención de muestras de sangre:**

Para la obtención de muestras sanguíneas durante el test de ejercicio los equinos fueron canalizados, previa preparación aséptica de la piel, en la vena yugular derecha con un catéter N° 14 abbocath, el cual fue fijado a la piel con un punto de sutura. El catéter se conectó a un prolongador cristal. La vía se mantuvo heparinizada para evitar la coagulación de la sangre.

Las muestras de sangre se tomaron:

- con el animal en reposo previo al ejercicio (T0 o Reposo)
- al llegar al punto de fatiga (T1 o ejercicio)
- al finalizar la recuperación (T2 o recuperación) (Muriel, 2016).

Las muestras (5 ml de sangre) fueron colocadas en tubos con heparina, homogeneizadas inmediatamente y procesadas al finalizar la extracción de las tres muestras correspondientes al test de ejercicio, no transcurriendo más de una hora entre la obtención y el inicio del procesamiento.

### **Procesamiento de muestras:**

#### **Hematología:**



Foto 2: Procesamiento de la muestra de sangre

La primera etapa de procesamiento consistió en la realización de las determinaciones correspondientes al hemograma (recuento de glóbulos rojos, hematocrito y medición de la concentración de hemoglobina).

Las mismas fueron realizadas en un autoanalizador hematológico (Sysmex KX 21) que se encuentra en el Servicio Central de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad

Nacional de La Plata (foto 2).

#### **Obtención de la suspensión de eritrocitos lisados:**

Los eritrocitos fueron separados del resto de los componentes sanguíneos por centrifugación (1000 g por 10 min a 4°C) en centrifuga refrigerada marca Biofuge 15R (foto 3). El plasma y el “buffy coat” (resto de los componentes formes) fueron descartados. El pellet obtenido fue lavado tres veces en buffer fosfato isotónico (PBS 5 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl). Finalmente, a partir del concentrado de



Foto 3: Centrifuga refrigerada

eritrocitos lavados, se procedió a la lisis de los mismos mediante el agregado de una

solución de PBS 5 mM, homogeneizado y mantenido en hielo durante 30 min (Dodge y col., 1963). Las suspensiones obtenidas fueron mantenidas a 4°C.

Esta etapa se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata.

### **Peroxidación de las muestras y análisis por quimioluminiscencia:**

La etapa final consistió diluir las suspensiones de eritrocitos lisados en una solución de lavado (PBS 5 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl), hasta una concentración final de 0,25 mg/ml de hemoglobina, de acuerdo al valor de hemoglobina obtenido previamente. Una vez diluidas las muestras, las mismas fueron incubadas con la adición de 2 mM de t-BHP [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA] durante 40 min a 37°C. Idénticas alícuotas de la preparación fueron también incubadas bajo las mismas condiciones, pero sin la adición de t-BHP como el experimento control para los productos de peroxidación endógenos en la preparación de eritrocitos lisados.

Durante la incubación se realizó la medición de la emisión de luz mediante un analizador de centelleo líquido (Packard 1900 TR) para la determinación del porcentaje de peroxidación de cada muestra (fotos 4 y 5). La quimioluminiscencia se determinó durante un período de 40 min y se registró como recuento por minuto (cpm) cada 10 min.



Fotos 4 y 5: Analizador de centelleo líquido

Esta etapa también fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata.

**Análisis estadístico:**

Los datos obtenidos fueron considerados en forma independiente para cada una de las determinaciones, y se hallan presentados como su media  $\pm$  ES. Se realizó el test de t de Student's (<http://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/Default2.aspx>), asumiendo una sola cola de distribución y varianzas iguales entre muestras para analizar la presencia o no de variaciones significativas ( $P < 0.05$ ) entre las medias de los diferentes valores experimentales (T0, T1 y T2). Las posibles asociaciones entre las variables analizadas (valores hematológicos y peroxidación) se realizaron a través del coeficiente de correlación (Pearson) ajustado (SSPS® Versión 11).

**Resultados:****Valores hematológicos:**

La tabla I, así como los gráficos 1 a 4, muestran el comportamiento de los parámetros de la serie roja evaluada durante el presente trabajo. Los equinos comenzaron el test de ejercicio (T0) con una cantidad media de eritrocitos de  $8,44 \times 10^6$  células/ $\mu$ l ( $\pm 0,32$ ), llegando en T1 a un valor de  $11,65 \times 10^6$  células/ $\mu$ l ( $\pm 0,25$ ), y al finalizar la prueba (T2), el valor medio fue de  $10,15 \times 10^6$  células/ $\mu$ l ( $\pm 0,26$ ), [gráfico 1].

El valor hematocrito aumentó en la fase inicial del test de ejercicio, presentando valores basales de 35,4% ( $\pm 0,9$ ) en T0, incrementándose a 53,6% ( $\pm 0,4$ ) en T1 y reduciéndose finalmente a 45,9% ( $\pm 0,9$ ) en T2, [gráfico 2].

En relación a la concentración de hemoglobina, la misma presentó una dinámica similar, siendo los valores obtenidos de 12,93 g/dl ( $\pm 0,2$ ); 18,09 g/dl ( $\pm 0,2$ ) y 15,63 g/dl ( $\pm 0,3$ ) para T1, T2 y T3 respectivamente, [gráfico 3].

**Tabla I: Valores hematológicos**

Parámetro	Tiempo de extracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	media $\pm$ ES
Hematocrito %	T0	40,1	38,6	38,0	33,2	36,8	34,2	36,8	31,9	31,5	35,3	38,1	37,2	26,4	35,8	36,5	35,4 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>
	T1	55,6	52,4	53,0	51,0	52,7	54,3	55,9	52,9	52,1	55,3	52,3	53,4	55,6	55,1	52,0	53,6 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
	T2	50,2	42,6	45,0	44,7	41,5	49,2	50,2	46,4	48,3	44,8	42,0	41,9	51,6	46,5	43,8	45,9 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>
Recuento de GR $10^6$ cél/ $\mu$ l	T0	10,0	10,1	9,5	7,3	7,7	7,2	8,4	7,0	6,7	7,4	10,3	9,7	9,2	8,5	7,7	8,4 $\pm$ 1,2 <sup>1</sup>
	T1	13,6	12,5	13,2	10,7	10,6	10,9	12,2	10,9	10,7	11,2	12,6	11,3	12,0	11,3	11,1	11,6 $\pm$ 1,0 <sup>1</sup>
	T2	12,4	10,6	11,2	9,5	8,6	9,9	11,0	9,7	9,8	9,3	11,1	9,5	10,9	9,6	9,4	10,2 $\pm$ 1,0 <sup>1</sup>
Hemoglobina g/dl	T0	13,3	12,9	13,2	12,4	13,5	12,5	13,2	11,8	11,9	13,1	12,8	13,6	13,5	13,8	12,5	12,9 $\pm$ 0,6 <sup>*</sup>
	T1	18,3	16,4	17,1	17,7	18,6	19,1	18,9	18,1	18,7	19,7	16,8	17,2	18,6	18,5	17,6	18,1 $\pm$ 1,9 <sup>#</sup>
	T2	16,0	14,2	13,7	15,7	14,9	17,3	17,0	16,2	16,3	16,1	13,2	14,5	16,7	16,8	15,9	15,6 $\pm$ 1,2 <sup>#</sup>

ab; 12; #: medias con diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En la tabla I puede apreciarse el comportamiento individual de los tres valores hematológicos analizados para cada una de las muestras obtenidas durante la

realización del test de ejercicio, mientras que en el gráfico 4 se muestra el valor promedio obtenido para cada determinación en los tres tiempos analizados.

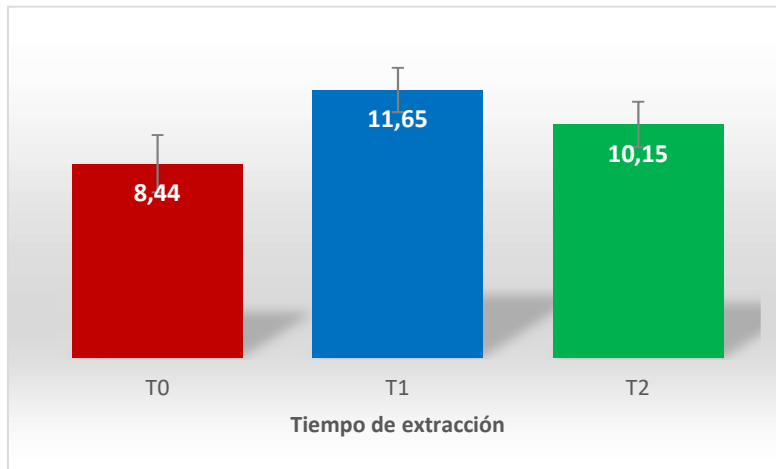


Gráfico 2: Hematocrito (%)

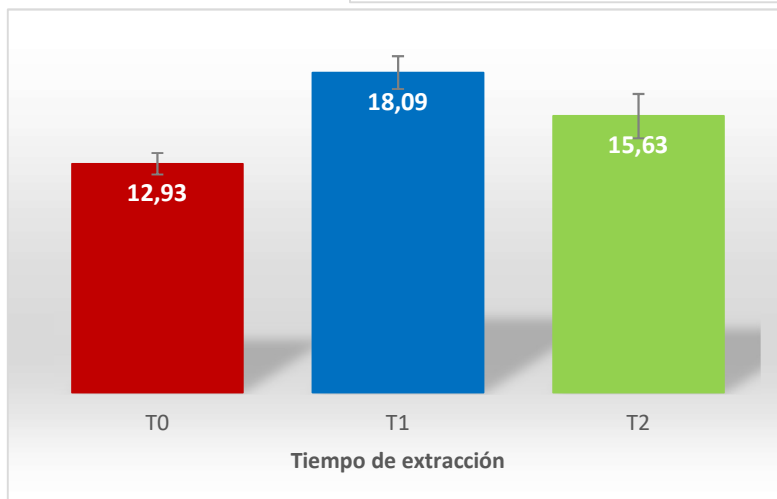
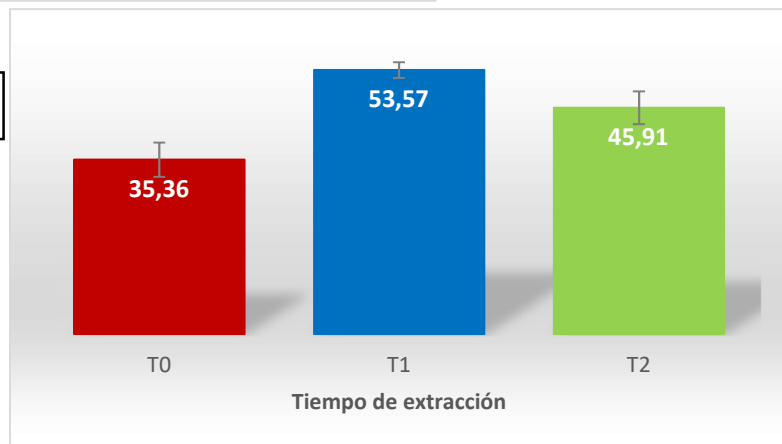
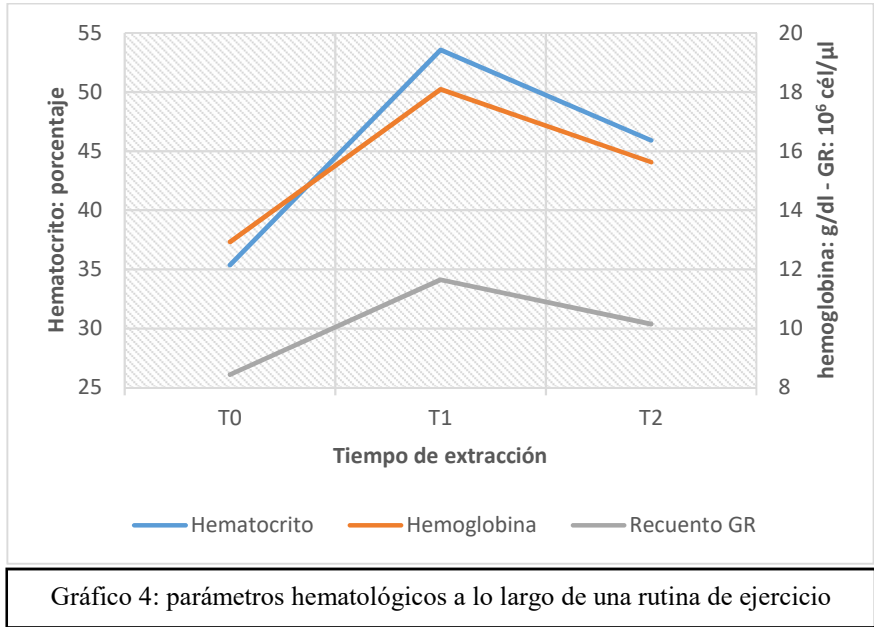


Gráfico 3: Hemoglobina (g/dl)

Si bien los tres parámetros analizados presentaron una distribución similar a lo largo de la rutina de ejercicio, los valores basales (T0) solo fueron diferentes a los observados en T1 en la medición del hematocrito ( $p = 0,021$ ), y de la concentración de hemoglobina ( $p = 0,010$ ); no siendo estadísticamente significativa las diferencias observadas para el número total de glóbulos rojos por  $\mu$ l de sangre.

Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar los valores obtenidos una vez finalizado el test de ejercicio (T2), tanto en relación con los valores iniciales (T0) como con los datos provenientes de las muestras obtenidas al momento de fatiga (T1).



**Grado de peroxidación:**

La adición de t-BHP a la suspensión de eritrocitos lisados de equinos dio lugar a la peroxidación la que fue evidenciada mediante la emisión de luz.

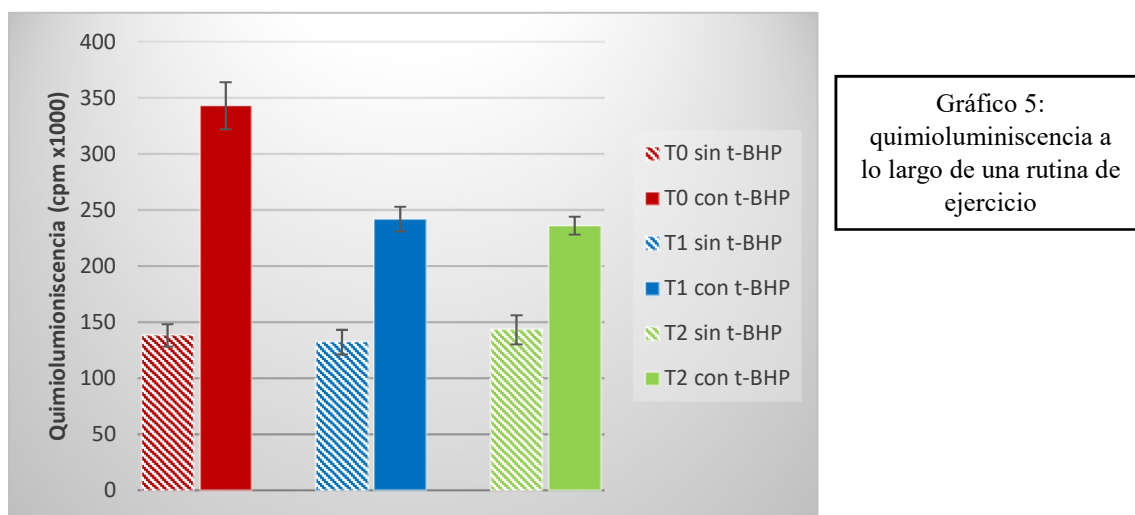
Al comparar los valores obtenidos en los tres tiempos analizados (T0, T1 y T2), con o sin la adición de t-BHP, estos siempre fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias cuando se analizaron los datos de cpm totales obtenidos en las muestras procesadas sin la adición de t-BHP, para ninguno de los tiempos estudiados. Estos resultados se muestran en la tabla II.

Tabla II: Emisión total de luz (cpm x 1000) de la suspensión de eritrocitos lisados																	
Tiempo de extracción	Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	media ± ES
T0	con t-BHP	260,1	370,9	281,7	271,2	401,2	246,1	400,5	425,0	277,9	495,5	401,2	252,5	401,2	401,2	256,2	342,8±10 <sup>a</sup>
	sin t-BHP	90,5	139,2	181,3	174,9	149,4	89,6	115,2	187,3	91,9	180,0	145,1	92,7	114,9	187,3	127,9	137,8±11 <sup>b</sup>
T1	con t-BHP	250,4	262,9	193,0	184,2	256,2	174,9	250,7	315,5	251,5	308,7	271,2	251,5	174,9	262,9	225,5	242,3±13 <sup>c</sup>
	sin t-BHP	98,2	99,5	112,0	122,9	150,2	93,9	78,1	145,1	190,7	199,2	150,2	94,9	89,6	174,9	185,9	132,3±21 <sup>b</sup>
T2	con t-BHP	234,9	275,4	141,3	210,2	243,2	224,2	234,3	278,7	240,3	231,0	250,7	234,7	234,3	260,1	250,7	236,3±11 <sup>c</sup>
	sin t-BHP	108,0	185,9	127,9	114,9	156,3	103,3	93,9	234,7	200,9	95,9	99,5	105,3	193,0	210,2	114,9	143,0±8 <sup>b</sup>

abc: medias con diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

Analizando los valores totales de quimioluminiscencia (cpm totales) a lo largo de la rutina de ejercicio, en las muestras a las que se les adicionó t-BHP, se encontraron diferencias entre los diversos tiempos, con valores observados de 342.830 cpm ( $\pm$  21.013), 242.258 cpm ( $\pm$  11.367) y 236.256 cpm ( $\pm$  8.245) para T0, T1 y T2 respectivamente. Estos resultados se muestran en el gráfico 5.

Los valores obtenidos fueron diferentes entre T0 y T1 y entre T0 y T2 ( $p = 0.011$  y  $0.003$  respectivamente). No existieron diferencias entre T1 y T2.



El gráfico 6 muestra los valores totales de quimioluminiscencia para cada muestra analizada, durante todo el tiempo de incubación.

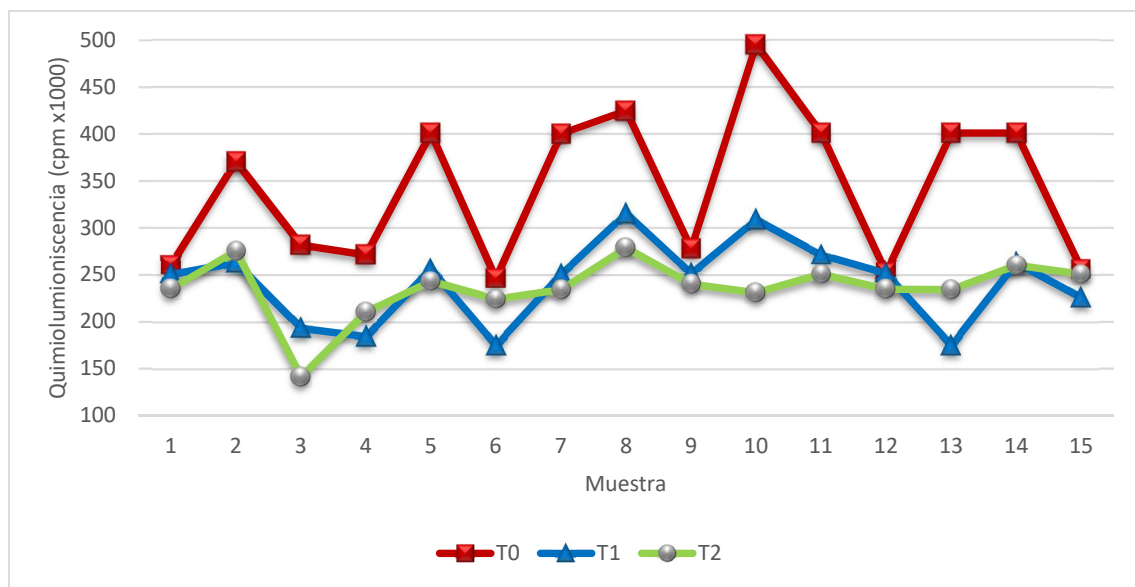


Gráfico 6: Valores totales de quimioluminiscencia de cada muestra

**Correlación entre variables:**

Se encontró una correlación positiva alta al comparar entre si las tres variables hematológicas analizadas (hematocrito, recuento de glóbulos rojos y concentración de hemoglobina), independientemente del momento de obtención de la muestra. Por el contrario, al comparar individualmente cada una de estas variables con los valores de quimioluminiscencia tras la adición de t-BHP a las suspensiones de eritrocitos lisados, el resultado es negativo (tabla III), lo que muestra que a pesar del aumento provocado por el test de ejercicio en el número de glóbulos rojos y sus variables asociadas (hematocrito y concentración de hemoglobina), las membranas de estas células presentan un mayor daño, evidenciado por el menor grado de quimioluminiscencia obtenido.

	<i>Hemat.</i>	<i>Rec. GR</i>	<i>Hemog.</i>	<i>Quimiol.</i>
<i>Hematocrito</i>	1			
<i>Recuento GR</i>	0,829	1		
<i>Hemoglobina</i>	0,931	0,709	1	
<i>Quimioluminiscencia</i>	-0,580	-0,481	-0,483	1

Tabla III: Valores de correlación entre variables
---



### **Conclusiones y discusión:**

El organismo responde de diversas maneras a la exigencia física, dicha respuesta se encuentra relacionada con el tipo y duración de la actividad. La respuesta se manifiesta en los diferentes sistemas que componen al individuo y en el sistema hematológico, específicamente la línea roja motivo de estudio en este trabajo, no es la excepción. La literatura menciona que inicialmente se puede apreciar hemoconcentración debido a la deshidratación por la pérdida de líquidos a través de la sudoración, además, es visible un incremento en la concentración de hemoglobina, hematocrito y número de eritrocitos mientras que el volumen plasmático disminuye conllevando así a la disminución del volumen sanguíneo total. Cuando el reto físico es más exigente u ocurre durante un mayor periodo de tiempo, estas variables tienden a aumentar (Bonilla, 2005).

Los incrementos observados en este trabajo en la concentración de hemoglobina, valor de hematocrito y número de glóbulos rojos, reflejan una hemoconcentración de carácter relativo que puede estar determinada por la movilización de eritrocitos desde el bazo (Persson, 1967), y por la salida de líquidos hacia el espacio extravascular como respuesta al ejercicio (Milne y col., 1976). Los incrementos en estas variables fueron similares.

En el caballo, aproximadamente el 33% de los eritrocitos están almacenados en el bazo durante el reposo, es así como, en el presente estudio se observaron aumentos en las tres variables hematológicas analizadas al llegar los equinos al punto de fatiga (T1), valor que, si bien disminuye luego de la recuperación, mantiene un valor elevado respecto al observado en T0.

En relación al daño en las membranas de los glóbulos rojos, existe cada vez más evidencia de la presencia de cambios inducidos por el ejercicio en el balance oxidante/antioxidante, dependiendo del tipo de ejercicio, intensidad y duración del mismo (Williams y col., 2005). Esto es debido a la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales causan daño celular y de los tejidos (Clarkson y Thompson, 2000). Muchos estudios han documentado el estrés oxidante inducido por el ejercicio mediante la medición de daño oxidativo a los componentes celulares. Entre los biomarcadores de daño oxidativo la peroxidación es un método ampliamente utilizado (Deaton y Marlin, 2003).

En el presente estudio, la peroxidación en las membranas de los eritrocitos se evaluó midiendo la emisión de luz en suspensiones de eritrocitos lisados de equinos sometidos a un ejercicio de alta intensidad, expuestas a un oxidante (t-BHP). Se

establece que un aumento en la velocidad de peroxidación produce un aumento paralelo en la fotoemisión. Dado que los radicales de oxígeno se producen continuamente en los eritrocitos mediante la autooxidación de la hemoglobina (Murakami y Mawatari, 2003), y los eritrocitos poseen mecanismos para su protección contra el daño oxidativo, incluyendo catalasa (Agar y col., 1986), superóxido dismutasa (Fee y Teitelbaum, 1972), y antioxidantes de bajo peso molecular tales como ascorbato (Meister, 1994), debemos considerar que la existencia de cambios en las membranas de los eritrocitos, evaluados mediante la peroxidación, es consecuencia del ejercicio físico. Los resultados sugieren claramente el ambiente pro-oxidante que prevalece en la sangre durante el ejercicio de alta intensidad, probablemente asociado a la liberación de ROS provocados por el ejercicio.

Relacionando los datos correspondientes a los parámetros hematológicos evaluados (número de GR, hematocrito y concentración de hemoglobina), con los valores de quimioluminiscencia obtenidos en los tres períodos analizados, la correlación inversa observada puede deberse a que si bien existe un aumento en los valores hematológicos, debido principalmente a una esplenotransfusión, los eritrocitos recirculantes presentan un daño considerable en sus membranas, consecuencia del ambiente oxidante predominante durante la etapa de máximo ejercicio, el cual se mantiene durante la etapa de recuperación del mismo.

**Nota:**

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto V227 de la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de La Plata.

## **Bibliografía:**

1. Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *Phys Sportsmed.* 2002; 30: 37-44.
2. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest.* 1986; 77: 319-21.
3. Bonilla J. Respuesta hematológica al ejercicio. *Revista de Ciencias de la Salud.* 2005; 3 (2): 206-16.
4. Boucher JH, Ferguson EW, Wilhelmsem CL. Erythrocyte alterations during endurance exercise in horses. *J Appl Physiol.* 1981; 51: 32-34.
5. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA Rodríguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia. *J Biol Chem.* 2000; 275: 25130-38.
6. Cimen M. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2008; 390: 1-11.
7. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72 (2): 637-46.
8. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids.* 1987; 45 251-68.
9. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract.* 2003; 2: 278-91.
10. Deldar A, Freging F, Bloom J, Davanipour Z. Changes in selected biochemical constituents of blood collected from horses participating in a 50-mile endurance ride. *Am J Vet Res.* 1982; 43 (12): 2239-43.
11. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol.* 1978; 45: 927-32.
12. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1963; 100: 119-30.
13. Drogue W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Phys Rev.* 2002; 82: 47-95.
14. Escribano B, Miller H, Zae MD. Observations on body weight and condition of horses. *J Equine Vet Sci.* 1995; 13: 310.

15. Evans DL, Harris RC, Snow DH. Correlation of racing performance with blood lactate and heart rate after exercise in Thoroughbred horses. *Equine Vet J.* 1993; 25: 441-45.
16. Evans DL, Rose RJ. Determination and repeatability of maximum oxygen uptake and other cardiorespiratory measurements in the exercise horse. *Equine Vet. J.* 1988; 20: 94-98.
17. Fee JA, Teitelbaum HD. Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 49: 150-58.
18. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006; 36: 327-58.
19. Garcia M, Guzman R, Cabezas M, Merino B, Palma C, Perez R. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. *Arch Med Vet.* 1999; 31 (2): 38-42.
20. Gohil K, Viguie C, Stanley WC. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol.* 1988; 64: 115-19.
21. Gómez C, Petróñ P, Andaur M, Pére R, Matamoros R. Post-Exercise Measurement of Physiological, Hematological and Biochemical Variables in Holsteiner Jumping Horses *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2004; XIV (3): 244-53.
22. Gouveia A, Harkins H, Pagan MN. Blood and muscle metabolic responses to draught work of varying intensity and duration in horses. *Res Vet Sci.* 2003; 47: 102-09.
23. Guillen CM, Lee R, Mark GW, Tomaselli CM, Nishiyasu T, Nadel ER. Plasma volumen expansión in human after a single intense excersice protocols. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991; 70: 1810
24. Gutteridge J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819-28.
25. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15: 129-35.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1980; 186: 1-85.
27. Herlax V, Vazquez R, Mate S, Bakás L. Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45: 287-96.

28. Iglesias BF, Catalá A. Rat, caprine, equine and bovine erythrocyte ghosts exposed to t-butyl hydroperoxide as a model to study lipid peroxidation using a chemiluminescence assay. *Res Vet Sci.* 2005; 79: 19–27.
29. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1986; 240: 1302-09.
30. Inayama T, Oka J, Kashiba M, Saito M, Higuchi M. Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci.* 2010; 70: 2039-46.
31. Jablonska EM, Ziolkowska SM, Gill J, Szykula R, Faff, J. Changes in some hematological and metabolic indices in young horses during the first year of jump training. *Equine Vet. J.* 1991; 23 (24): 309-11.
32. Ji L. Exercise, Oxidative Stress, and antioxidants. *Am J Sports Med.* 1996; 24: 20-22.
33. Ji L. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Society for Experimental Biology and Medicine* 1999; 222: 283-92.
34. Kästner SBR, Weishaupt MA, Fiege K, Auer JA. Heart rate and hematological responses of quarter horses to a reining competition. *J Equine Vet Sci.* 1999; 19 (2): 27-31.
35. Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux B. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J.* 2008; 177: 178-91.
36. Kumar A. Biomedical studies on lipid peroxidation and erythrocyte fragility during the process of aging. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1: 6-7.
37. Leleu C, Cotel C, Courouge-Malblanc A. Relationship between physiological variables and race performance in French Standardbred trotters. *Vet Rec.* 2005; 156: 339-42.
38. Lippi G, Banfi G, Montagnana M, Salvagno GL, Schena F, Guidi GC. Acute variation of leucocytes counts following a half-marathon run. *Int J Lab Hematol.* 2010; 32: 117-21.
39. López Chicharro J. Valoración del gasto energético en el ejercicio. En: López Chicharro J, Fernández Vaquero, A. *Fisiología del ejercicio.* 3° Ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana, 2008, p. 224-40.
40. Marlin DJM, Fenn K, Smith N, Deaton CD, Roberts CA, Harris PA, Dunster C, Kelly FJ. Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise. *Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of Age.* American Society for Nutritional Sciences. *J Nutr.* 2002; 132: 1622S-27S.
41. Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1985; 235: 529-31.

42. Mawatari S, Murakami K. Analysis of membrane phospholipid peroxidation by isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Biochem.* 1998; 264:118-23.
43. Mawatari S, Murakami K. Effects of ascorbate on membrane phospholipids and tocopherols of intact erythrocytes during peroxidation by t-butylhydroperoxide: comparison with effects of dithiothreitol. *Lipids.* 2001; 36: 57-65.
44. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 1994; 269: 9397-400.
45. Myhre L, Hartung G, Nunneley S, Tucker D. Plasma volume changes in middle-aged male and female subjects during marathon running. *J Appl Physiol.* 1985; 59: 559-63.
46. Milne DW, Skarda RT, Gabel AA, Smith LG, Ault K. Effects of training on Biochemical Values in Standardbred Horses. *Am J Vet Res.* 1976; 37: 285-90.
47. Murakami K, Mawatari S. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of  $\alpha$ -hemoglobin to membrane. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 417: 244-50.
48. Muriel MG. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2016.
49. Novosadova J. The changes in hematocrito, hemoglobin, plasma volume and proteins during and after different types of exercise. *Eur J Appl Physiol.* 1970; 36: 223-30.
50. Nuñiáñez RJ, Lapieza MG, Anson JL, Castillo MC, Giner A. Effects of a marathon race on the hematological and mineral parameters and on trait elements. *Arch Med Deporte.* 1993; 10 (40): 413-20.
51. Persson S. On blood volume and working capacity in horses. *Acta Vet Scand.* 1967; 19: 9-18.
52. Posada Arias S, García Naranjo R, Saldarriaga Restrepo A. Hematological values pre and post-exercise by gender and age in dogs that do agility in Antioquia. *Rev Med Vet (Bogotá).* 2013; 25: 49-62.
53. Reid SA, Speedy DB, Thompson JM, Noakes TD, Mulligan G, Page T, et al. Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. *Clin J Sport Med.* 2004; 14 (6): 344-53.

54. Remacha A, Ordonez J, García-Die F, Estruch A, Gimferrer E. Hematologic changes induced by exertion during a long-distance race. *Blood*. 1993; 38: 443-47.
55. Rubio Luque MD. Respuestas hematológicas, cardiovasculares y respiratorias al ejercicio. En: García Sacristan A. *Fisiología Veterinaria*. Madrid, España. Interamericana Mc Graw Hill, 1995, p. 1036-48.
56. Ruiz-Vicente DB, Salinero JJ, Del Coso J, González-Millán C, Abián-Vicén J, Areces F, Gallo-Salazar C, Fernández D. Efectos de una maratón en valores hematológicos *Arch Med Deporte*. 2013; 30(3):150-55.
57. Sajewicz W, Zalewska M, Milnerowicz H. Comparative study on thiol drugs effect on tert-butyl hydroperoxide induced luminol chemiluminescence in human erythrocyte lysate and hemoglobin oxidation. *Toxicol in Vitro*. 2015; 29: 148-54.
58. Sajewicz W. Effect of thiol drugs on tert-butyl hydroperoxide induced luminol chemiluminescence in human erythrocytes, erythrocyte lysate, and erythrocyte membranes. *Chem Biol Interact*. 2010; 186: 144-51.
59. Savignone CA, Ventura B, Mattioli G, Palacios A. Comparative study on tertbutyl hydroperoxide induced chemiluminescence in bovine, equine and canine erythrocyte lysate. *Research & Reviews in BioSciences*. 2016; 11 (1): 41-46.
60. Savignone C, Palacios A. Equine erythrocyte lysed exposed to t-butyl hydroperoxide as a model to study the oxidative stress caused by exercise using a chemiluminescence assay. *Glob J Med Res*. 2017; XVII (1): 19-24.
61. Schmidt W, Maassen N, Tegtbur U, Braumann M. Changes in plasma volume and red cell formation after a marathon competition. *Eur J Appl Physiol*. 1989; 58: 453-58.
62. Snow DH. Hematological, biochemical and physiological changes in horses and ponies during the cross country stage of driving trial competitions. *Vet Rec*. 1990; 126: 233-239.
63. Tesoriere L, Allegra M, D'Arpa D, Butera D, Livrea MA. Reaction of melatonin with hemoglobin-derived oxoferryl radicals and inhibition of the hydroperoxide-induced hemoglobin denaturation in red blood cells. *J Pineal Res*. 2001; 31: 114-19.
64. Tyler-Mcgowan CM, Golland LC, Evans DL, Hodgson DR, Rose RJ. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. *Equine Vet J*. 1999; 30: 621-25.

65. Udilova N, Jurek D, Marian B, Gille L, Schulte-Hermann R, Nohl H. Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41:1481-89.
66. Umbarila Barreto LF. Revisión de literatura de hallazgos hematológicos y fisiológicos en caballos atletas en la modalidad de competición completa de equitación. Monografía para optar al título de médico veterinario y zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, DC. 2007.
67. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002; 31 (2): 126-33.
68. Vollaard N, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* 2006; 35: 1045-62.
69. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, Saker KE, Waldron DE, Crandell KM, Harris PA. Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80 km races. *Equine Comp Ex Physiol.* 2005; 2: 153-57.
70. Zepeda AB, Farias JG. Antioxidants against oxidative stress induced by hypobaric hypoxia in testis and epididymis *Rev Farm Chile.* 2013; 6(1): 31-36.
71. Zou CG, Agar NS, Jone GL. Oxidative insult in sheep red blood cells induced by t-butyl hydroperoxide: the roles of glutathione and glutathione peroxidase. *Free Radic Res.* 2001; 34: 45–56.